

EUROPEAN PATENT OFFICE

Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 09119939
PUBLICATION DATE : 06-05-97

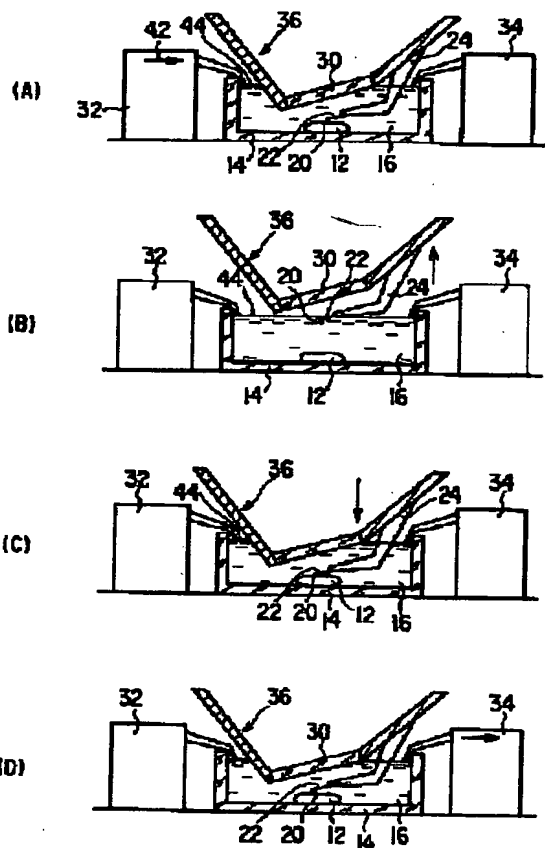
APPLICATION DATE : 25-10-95
APPLICATION NUMBER : 07277924

APPLICANT : OLYMPUS OPTICAL CO LTD;

INVENTOR : FUKUSHIMA NORICHIKA;

INT.CL. : G01N 37/00 G01B 21/30 H01J 37/28

TITLE : LIQUID-DIPPED SCANNING PROBE
MICROSCOPE DEVICE



ABSTRACT : **PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a liquid dipped scanning type probe microscope with less adhesion of air bubble to the surface of a member which is dipped in a solution.

SOLUTION: A probe 20, a cantilever 22, the entire portion of a window member 30, and one portion of a cantilever retention member 24 are sunk in a solution 16. After that, an interface activator is supplied onto the liquid surface of the solution 16 by a micro dispenser 32. Then, a head 36 is raised to such a height that the cantilever 22 and the probe 20 do not touch the activator on the liquid surface, thus adhering the interface activator to the cantilever retention member 24 and the window member 30. After that, the cantilever holding member 24 is sunk in the solution again. At this time, since the interface activator adhered to the cantilever holding member 24 and the window member 30 properly adapts itself to the interface activator on the liquid surface, no air bubble is generated on the surface. Finally, the interface activator remaining on the liquid surface is sucked by a collecting means 34.

COPYRIGHT: (C)1997,JPO

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平9-119939

(43)公開日 平成9年(1997)5月6日

(51)Int.Cl.⁶

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所

G 0 1 N 37/00

G 0 1 N 37/00

F

G 0 1 B 21/30

G 0 1 B 21/30

Z

H 0 1 J 37/28

H 0 1 J 37/28

Z

審査請求 未請求 請求項の数2 OL (全7頁)

(21)出願番号

特願平7-277924

(22)出願日

平成7年(1995)10月25日

(71)出願人 000000376

オリンパス光学工業株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

(72)発明者 福島 徳近

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ

ンパス光学工業株式会社内

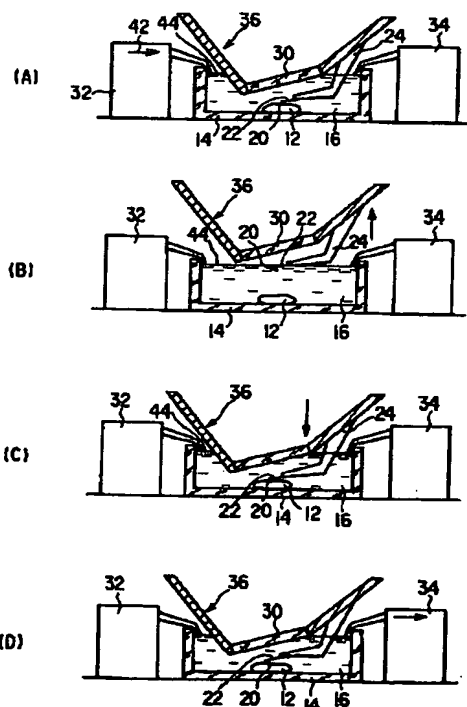
(74)代理人 弁理士 鈴江 武彦

(54)【発明の名称】 液浸走査型プローブ顕微鏡装置

(57)【要約】

【課題】溶液中に浸る部材の表面に対する気泡の付着が少ない液浸走査型プローブ顕微鏡を提供する。

【解決手段】探針20とカンチレバー22と窓部材30の全体とカンチレバー保持部材24の一部を溶液16に沈める。その後、マイクロディスペンサー32により溶液16の液面上に界面活性剤を供給する(A)。次に、カンチレバー22と探針20が液面上の界面活性剤に触れない高さまでヘッド36を上昇させる(B)。これによりカンチレバー保持部材24と窓部材30には界面活性剤が付着する。続いて、カンチレバー保持部材24を再び溶液中に沈める(C)。このとき、カンチレバー保持部材24と窓部材30に付着した界面活性剤は液面上の界面活性剤と良くなじむため、これらの表面に気泡は生じない。最後に、回収手段34を用いて液面上に残る界面活性剤を吸引する(D)。



【特許請求の範囲】

【請求項1】容器に入れた溶液中に配置された試料を探針を用いて観察する液浸走査型プローブ顕微鏡において、親水化処理された、先端に探針を備えたカンチレバーと、カンチレバーを保持するカンチレバー保持部材と、カンチレバーおよびカンチレバー保持部材を溶液中に浸入待避させる手段と、溶液の液面上に界面活性剤を供給する手段とを備えており、試料の観察に先立ち、カンチレバーの全体とカンチレバー保持部材を溶液中に沈め、溶液の液面上に界面活性剤を供給して液面上に界面活性剤の薄膜を形成し、カンチレバーが界面活性剤に触れない範囲でカンチレバー保持部材をなるべく引き上げ、再びカンチレバー保持部材を下げることを特徴とする液浸走査型プローブ顕微鏡。

【請求項2】請求項1において、カンチレバーの変位を光学的に検出する変位検出系と、変位検出系を溶液から保護するために変位検出系を収容する筐体とを備え、筐体は、変位検出系とカンチレバーとの間での光の往来を許す光学的に透明な窓部材を有し、窓部材は液面に対して斜めに配置されており、試料の観察に先立ち、窓部材を溶液中に沈め、溶液の液面上に界面活性剤を供給して液面上に界面活性剤の薄膜を形成し、窓部材を引き上げ、再び窓部材を溶液中に沈めることを特徴とする液浸走査型プローブ顕微鏡。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は走査型プローブ顕微鏡装置に関する。

【0002】

【従来の技術】走査型プローブ顕微鏡は、試料の走査中に表面の形状に沿って追従する探針の挙動を検出することによって、試料の微細な形状を観察する装置であり、探針を追従させる手段の種別によって、走査型トンネル顕微鏡（STM）、原子間力顕微鏡（AFM）、磁気力顕微鏡（MFM）などが知られている。

【0003】例えば、原子間力顕微鏡（AFM）では、試料表面を走査する探針は柔軟なカンチレバーに支持され、カンチレバーまたは試料は圧電体等の微動素子を有する微動変位調整装置に支持され、探針と試料の間隔が調整可能となっている。探針を試料表面に近づけると、

探針先端の原子と試料表面の原子の間に、ファンデルワールス相互作用による引力が働き、さらに原子の相互距離程度にまで近づけると、今度はパウリの排他律による斥力が働く。これらの引力と斥力は総称して原子間力と呼ばれる。原子間力は極めて微弱だが、探針を支持しているカンチレバーは、非常に柔軟であるため、探針先端の原子が原子間力を受けると、その大きさに応じて変位する。微動変位調整装置は、カンチレバーの変位量を一定に保つように、探針と試料の間隔をフィードバック制御する。このフィードバック制御時に圧電体等の微動素子に印加する電圧は、探針が走査している試料表面の形状に対応しているため、この印加電圧情報より試料表面の高さ情報が得られ、これを試料表面上の位置情報と併せて処理することで試料表面の凹凸像が得られる。

【0004】この走査型プローブ顕微鏡装置を用いて水溶液中に保存した細胞等の生体試料を観察できれば、電子顕微鏡のような試料の固定や真空下での観察とは異なり、生きたままの状態、試料の形状や、探針に加わる力の解析による表面の物性の計測などを数nmの分解能で行なうことが可能となるため、溶液中で使用可能な走査型プローブ顕微鏡装置の開発が色々試みられている。

【0005】その代表的な例として米国特許4935634号に開示されている走査型プローブ顕微鏡を図5と図6に示す。図5は走査型プローブ顕微鏡の全体の構成を示す断面図であり、図6（A）は図5の探針保持部を下から見た図、図6（B）は探針保持部の断面図である。

【0006】図5に示すように、カンチレバー105を支持する探針保持部材101と、圧電体102上に設けられた試料台103は、両者の間に配置されたリング状の部材104に接触しており、これらの部材に囲まれた空間が水溶液で満たされる。図6に示すように、リング状の部材104の内側に位置する探針保持部材101の天井部分には、溶液を送り込むための供給管110と排出するための排出管111が設けられている。これにより、細胞等の生体試料を浸漬し、生きたまま保存するための酸素の供給や溶液の温度調整を可能にしている。図5に戻り、試料台103上に置かれた試料は圧電体102によって移動され、これによりカンチレバー105の先端に設けられた探針が走査される。走査の間、探針の変位は、カンチレバー105の上面に光を照射するレーザー光源106と、その反射光を受ける受光素子107とで構成される変位検出系により検出される。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】液浸用走査型プローブ顕微鏡装置では、測定の際には、上の例の様に所定の空間に溶液を注入したり、あるいは、探針を備えるカンチレバーを試料容器に溜めた溶液の中に沈めたりする。このとき、カンチレバーやカンチレバー保持部材の表面に

気泡が付着することがある。いったん発生してしまった気泡は取り除くことが難しい。このような気泡は、走査の障害となり、また同時に使用される顕微鏡観察の障害となり好ましくない。

【0008】探針とカンチレバーに関しては、親水化処理を施すことにより、気泡の発生を防止することができる。親水化処理は、例えば、窒化シリコン製のカンチレバーに対して、酸化プラズマ処理を施したり、紫外線を照射したりすることにより行なえる。しかし、カンチレバー保持部材は一般に金属で作られるため、親水化処理を施すことができない。

【0009】水溶液中の部材の表面への気泡の付着を防ぐ方法として、水溶液中に界面活性剤を混入することが一般に知られているが、観察対象である標本が生体試料である場合には、水溶液中への界面活性剤の混入は、試料の保存の都合上好ましくない。

【0010】また、液浸用走査型プローブ顕微鏡装置には光てこ方式の変位検出系を用いたものがあり、この場合、防水の目的で、光学的に透明な防水用窓部材がカンチレバーと変位検出系との間に配置されるのが一般的である。この防水用窓部材に対しても、溶液を注入する際や探針を沈める際に、気泡が付着することがあり、この気泡もやはり取り除くことが難しい。防水用窓に付着した気泡は、光てこ方式の変位検出系におけるカンチレバーに向かうレーザー光やカンチレバーからの反射光を散乱させたりする。これは、変位検出精度の低下の原因となり好ましくない。また、同時に使用される光学顕微鏡による観察にとっても障害となり好ましくない。本発明の目的は、溶液中に浸る部材の表面に対する気泡の付着が少ない液浸走査型プローブ顕微鏡を提供することである。

【0011】

【課題を解決するための手段】本発明は、容器に入れた溶液中に配置された試料を探針を用いて観察する液浸走査型プローブ顕微鏡において、親水化処理された、先端に探針を備えたカンチレバーと、カンチレバーを保持するカンチレバー保持部材と、カンチレバーおよびカンチレバー保持部材を溶液中に浸入待避させる手段と、溶液の液面上に界面活性剤を供給する手段とを備えており、試料の観察に先立ち、カンチレバーの全体とカンチレバー保持部材を溶液中に沈め、溶液の液面上に界面活性剤を供給して液面上に界面活性剤の薄膜を形成し、カンチレバーが界面活性剤に触れない範囲でカンチレバー保持部材をなるべく引き上げ、再びカンチレバー保持部材を下げることを特徴とする。

【0012】さらに、上記の構成において、カンチレバーの変位を光学的に検出する変位検出系と、変位検出系を溶液から保護するために変位検出系を収容する筐体とを備え、筐体は、変位検出系とカンチレバーとの間での光の往来を許す光学的に透明な窓部材を有し、窓部材は

液面に対して斜めに配置されており、試料の観察に先立ち、窓部材を溶液中に沈め、溶液の液面上に界面活性剤を供給して液面上に界面活性剤の薄膜を形成し、窓部材を引き上げ、再び窓部材を溶液中に沈めることを特徴とする。

【0013】

【発明の実施の形態】以下、図面を参照しながら本発明の実施の形態について説明する。

＜第一の実施の形態＞まず、第一の実施の形態について図1～図3を用いて説明する。

【0014】図1(A)に示すように、試料12は容器14の底部に置かれ、容器14には試料12を浸漬するための溶液16が満たされる。容器14は機械式のXYステージ18の上に置かれ、探針20に対する試料12の位置決めを行なうことができる。XYステージ18の上には、容器14の両側に、溶液16の液面に界面活性剤を供給する手段であるマイクロディスペンサー32と、液面に供給された界面活性剤を回収する回収手段34とが設けられている。

【0015】図1(B)に示すように、探針20はカンチレバー22の先端に設けられており、カンチレバー22はカンチレバー保持部材24に取り付けられ支持される。探針20とカンチレバー22は、材質に窒化シリコンを使用し、10秒間程度の酸化プラズマ処理を施すことによって、接触角10度以下の親水性が達成されている。窒化シリコンの表面の親水処理は紫外線照射によっても得られる。カンチレバー保持部材24は、その断面形状を図1(C)に示すように、上面24aと下面24bはV字形状となっている。カンチレバー保持部材24は、図1(A)に示すように、ヘッド36に着脱可能に取り付けられていて、カンチレバー22を交換する際の作業性向上が図られている。また、カンチレバー保持部材24の先端部のカンチレバー22の近傍に圧電素子を利用した励磁手段を取り付けて、カンチレバー22を一定の振幅で振動させながら試料に外力を加えることなく測定する、いわゆるACモードのAFM測定を行なってもよい。

【0016】ヘッド36は、カンチレバー22の上方に位置する部分に光学的に透明な窓部材30が斜めに取り付けられており、全体は密閉されていて溶液が浸入しないようになっている。ヘッド36の内部には、カンチレバー22の上面にレーザービームを照射するレーザー光源26と、カンチレバー22の上面からの反射光を受ける受光素子28が収容されている。受光素子28は入射光量に応じた出力を示す複数の受光領域を有しており、カンチレバー22の変位は受光素子28の受光領域上に形成される反射光のスポットの位置から求められる。

【0017】ヘッド36は円筒型圧電体38によって支持されており、円筒型圧電体38は昇降手段40に取り付けられている。ヘッド36は円筒型圧電体38によ

てXY走査およびZ位置制御のための水平方向および垂直方向の移動が可能となっている。また、ヘッド36は昇降手段40により上下に粗動可能となっており、例えば、容器14を交換する際には容器14を出し入れするための空間を確保するために上方に待避される。

【0018】以下、図2と図3を用いて、カンチレバー22およびカンチレバー保持部材24を溶液16に沈める手順について説明する。まず、昇降手段40を用いてヘッド36を下降させて、図2(A)に示すように、探針20とカンチレバー22と窓部材30の全体とカンチレバー保持部材24の一部を溶液16に沈める。探針20とカンチレバー22は親水化処理されているので、これらに気泡が付着することはない。その後、マイクロディスプレイペンサー32を用いて所定量の界面活性剤を溶液16の液面上に供給し、液面に界面活性剤42の単分子膜44を形成する。供給する界面活性剤42の量は、液面に単分子膜を形成するのに必要な量であり、容器14の開口部の面積により決まる。このとき、液面の界面活性剤の各分子46は、図3(A)に示すように、溶液16側に親水基46aを、大気側に疎水基46bを向けて液面に並ぶ。使用する界面活性剤としては例えばステアリン酸バリウムがあげられる。

【0019】次に、昇降手段40を用いて、図2(B)に示すように、カンチレバー22と探針20が界面活性剤の単分子膜44に触れない高さまでヘッド36を上昇させる。このとき、窓部材30の全体とカンチレバー保持部材24の殆どの部分が大気中に引き上げられる。カンチレバー保持部材24が溶液16から引き上げられる際、液面上の界面活性剤の分子46は、図3(B)に示すように、カンチレバー保持部材24の表面に親水基46aを向けて付着する。図にはカンチレバー保持部材24のみが示されているが同様に窓部材30の表面にも親水基46aを向けて付着する。この結果、カンチレバー保持部材24と窓部材30の表面には、疎水基46bが大気中に向いた界面活性剤の被膜48が形成される。カンチレバー保持部材24の上面と下面は図1(C)に示したようにV字形状となっているので、上面と下面にも界面活性剤の被膜48が良好に形成される。このとき、探針20とカンチレバー22は親水化処理が施されているので、これらの表面には界面活性剤の被膜が形成されない様に注意することが肝要である。

【0020】なお、図2に示されるようにカンチレバー保持部材24は、カンチレバー22の先端部から基端部方向に徐々に溶液16に浸入するように溶液16の液面に対して傾斜して構成することが好ましい。このように構成することにより、カンチレバー22を界面活性剤に触れさせずにカンチレバー保持部材24を有効に親水化処理することができる。

【0021】続いて、昇降手段40を用いてヘッド36を下降させて、図2(C)に示すように、探針20を試

料12の表面近くまで近づける。このとき、カンチレバー保持部材24と窓部材30の表面には外側に疎水基46bが向いた界面活性剤の被膜が形成されており、液面には大気側に疎水基46bを向けた界面活性剤の単分子膜があるので、カンチレバー保持部材24と窓部材30が再び溶液中に沈む際に、図3(C)に示すように、液面上の界面活性剤はカンチレバー保持部材24と窓部材30の表面の界面活性剤の被膜に良好に付着し、外側に親水基46aが向いた二層目の界面活性剤の被膜が形成される。この結果、カンチレバー保持部材24と窓部材30は表面に気泡が付着することなく溶液中に沈められる。

【0022】最後に、図2(D)に示すように、回収手段34を用いて、液面に接したノズルから液面上に残る界面活性剤を吸引する。この結果、図3(D)に示すように、界面活性剤は、カンチレバー保持部材24と窓部材30および溶液中に浸っている部材の周辺を除いて回収される。これで、AFM測定の準備が完了する。

【0023】＜第二の実施の形態＞次に、第二の実施の形態について図4を用いて説明する。XYステージ18の上には、二個の圧電体52によってXY方向に移動される微動ステージ54が設けられており、試料12と溶液16を入れた容器14は微動ステージ54の上に配置される。

【0024】走査の際、試料12は微動ステージ54によってXY方向に移動される。従って、円筒型圧電体38は、ヘッド36をZ方向に移動させるための伸縮動作を行なうだけで、これをXY方向に移動させるための湾曲動作は行なわない。

【0025】他の構成および作用は前述の第一の実施の形態と同じである。この実施の形態では、円筒型圧電体38はXY方向への移動のための湾曲動作が不要なので、その外径を大きくすることが許される。円筒型圧電体の外径を大きくすることにより、光学顕微鏡用の観察に有利な開口数の大きな大型のコンデンサレンズ等を内側に配置することが可能である。

【0026】本発明は、上述の実施の形態に何等限定されるものではない。発明の要旨を逸脱しない範囲で行なわれる実施は、すべて本発明に含まれる。本明細書には以下の各項に記した発明が含まれている。

【0027】1. 例えば生理食塩水等の溶液が満たされたシャーレ等の容器内に固定された試料表面を、溶液中に挿入した探針保持部材に締結された探針によって走査することにより試料の形状等の情報を得る液浸走査型プローブ顕微鏡装置において、水に不溶性の界面活性効果を有する物質(界面活性剤)の単分子膜を、容器に満たした溶液の液面上に形成し、探針を溶液中に導入する際にカンチレバー保持部材の表面に界面活性剤自身の吸着性を利用して被膜を形成することを特徴とする液浸走査型プローブ顕微鏡装置。

【0028】[効果] 溶液中に導入した探針保持部材の表面に界面活性剤の分子が、親水基を外側に向けて被膜を形成することにより、液中に導入される探針保持部材の表面の気泡の発生を低減できるため、安定した観察操作が可能な走査型プローブ顕微鏡装置が提供される。

【0029】2. 第1項において、カンチレバー保持部材の表面に界面活性剤の被膜を形成させる過程で、一度大気中から溶液中に導入した探針保持部材のみ液面より引き上げ、かかる後、再度、溶液中に導入することによって、カンチレバー保持部材表面に親水性の被膜を形成する動作プロセスを有することを特徴とする液浸走査型プローブ顕微鏡装置。

【0030】[効果] 探針先端には界面活性剤分子が付着せず、探針先端への異物の付着を原因とする走査画像の画質の劣化が防止される。

3. 第1項において、カンチレバー保持部材の断面形状の上面と下面がV字形状を有することを特徴とする液浸走査型プローブ顕微鏡装置。

【0031】[効果] カンチレバー保持部材の上面と下面の断面形状がV字型であるため、溶液の液面上に形成された界面活性剤の薄膜面を通過する際の保持部材表面への界面活性剤の被膜形成が容易となり、界面活性剤による気泡発生の低減効果の優れた走査型プローブ顕微鏡装置が得られる。

【0032】4. 第1項ないし第3項において、界面活性剤を溶液の液面上に供給する手段を有することを特徴とする液浸走査型プローブ顕微鏡装置。

[効果] 界面活性剤の供給手段を備えているので、ディスペンサー等の供給手段を別途に準備する必要がなく、溶液の液面上に界面活性剤の薄膜を観察操作の都度容易に形成することができる、操作性に優れた走査型プローブ顕微鏡装置が得られる。

【0033】5. 第1項ないし第4項において、溶液の液面上の界面活性剤を回収する手段を有することを特徴とする液浸走査型プローブ顕微鏡装置。

[効果] 界面活性剤の回収手段を備えているので、溶液の液面上に形成された界面活性剤の薄膜を回収することができ、観察中の生体試料の保存のために溶液を還流させる場合には、液面上の界面活性剤が試料に達する可能性が低減される。また、界面活性剤にステアリン酸バリウム等の水に不溶性物質を使用して溶液中への混入を防止しているため、試料保護性に優れた走査型プローブ顕微鏡装置が得られる。

【0034】6. 水に不溶性の界面活性効果をもつ物質（界面活性剤）の単分子膜を、容器に満たした溶液の液面上に形成し、探針を溶液中に導入する際に、カンチレバーの変位を検出するためにカンチレバー上方に配される例えば光てこ方式等の変位検出手段の保護の目的でカンチレバーと変位検出手段の間に配される防水用窓部材の表面に界面活性剤自身の吸着性を利用して被膜を

形成することを特徴とする液浸走査型プローブ顕微鏡装置。

【0035】[効果] 溶液中に導入した窓部材の表面に界面活性剤の分子が、親水基を外側に向けて被膜を形成することにより、液中に導入される窓部材の表面の気泡の発生を低減できるため、正確な変位検出が可能な走査型プローブ顕微鏡装置が提供される。

【0036】7. 第6項において、防水用窓部材の表面に界面活性剤の被膜を形成させる過程で、一度大気中から溶液中に導入した探針保持部材のみ液面より引き上げ、かかる後、再度、溶液中に導入することによって、防水用窓部材の表面に親水性の被膜を形成する動作プロセスを有することを特徴とする液浸走査型プローブ顕微鏡装置。

【0037】[効果] 窓部材に付着した界面活性剤と液面上の界面活性剤は良くなじむので、窓部材を再び溶液中に沈める際、窓部材の表面には気泡が生じない。

8. 第6項において、防水用窓部材が液面に対して傾斜して配置されていることを特徴とする液浸走査型プローブ顕微鏡装置。

[効果] 窓部材が液面に対して傾斜しているので、窓部材に界面活性剤の被膜が良好に形成される。

【0038】

【発明の効果】本発明によれば、探針とカンチレバーとカンチレバー保持部材に対する気泡の付着が少なくなるので、良好な走査が行なえるとともに、光学顕微鏡による観察も良好に行なえる。

【0039】また、窓部材に対する気泡の付着が少なくなるので、正確な変位検出を行なえるようになる。さらに、界面活性剤は溶液中に混入しないので、生体試料に悪影響を与えることもない。

【図面の簡単な説明】

【図1】(A)は本発明の第一の実施形態による液浸走査型プローブ顕微鏡の構成を示す図、(B)は(A)のカンチレバー保持部材を拡大して示す図、(C)は(B)の1C-1C線によるカンチレバー保持部材の断面図である。

【図2】図1の液浸走査型プローブ顕微鏡における測定準備の手順を説明するための図である。

【図3】図2の手順に関連して、気泡が生じること無くカンチレバー保持部材が溶液中に沈められる様子を説明するための図である。

【図4】本発明の第二の実施形態による液浸走査型プローブ顕微鏡の構成を示す図である。

【図5】溶液中の試料を観察する走査型プローブ顕微鏡の全体の構成を示す断面図である。

【図6】(A)は図5の探針保持部を下から見た図、(B)は探針保持部の断面図である。

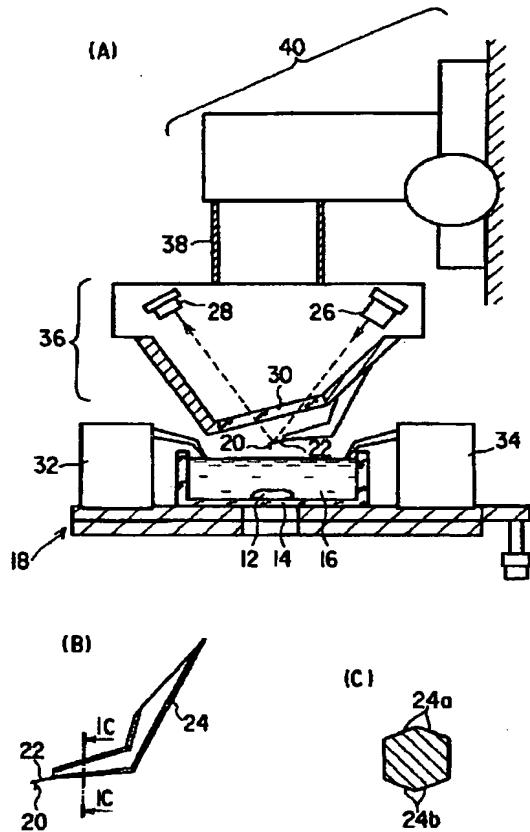
【符号の説明】

12…試料、14…容器、16…溶液、20…探針、2

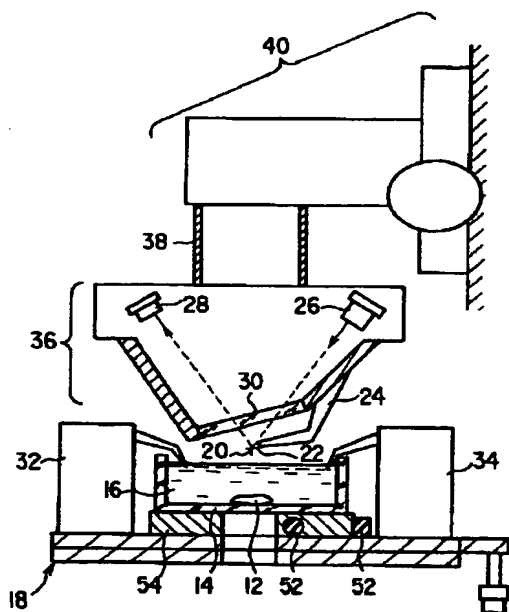
2…カンチレバー、24…カンチレバー保持部材、26
…レーザー光源、28…受光素子、30…窓部材、32

…マイクロディスペンサー、36…ヘッド、40…昇降
手段。

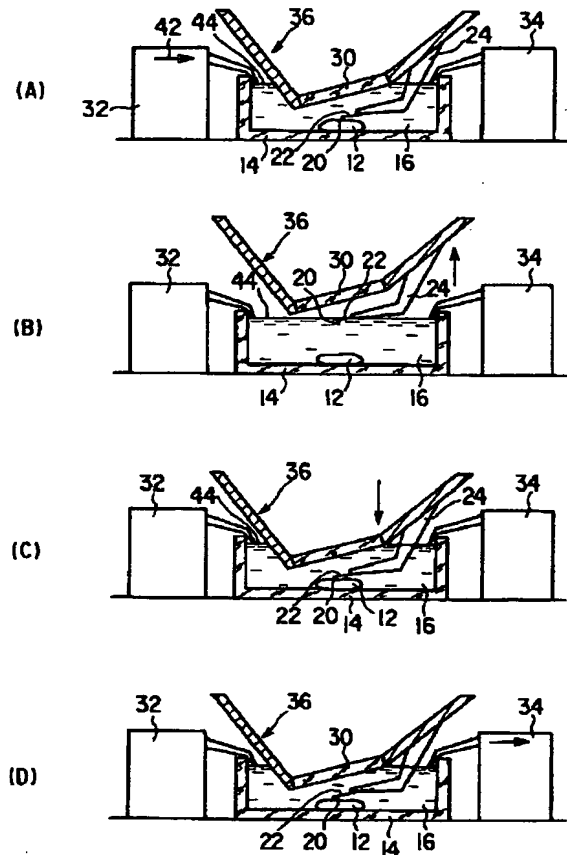
【図1】



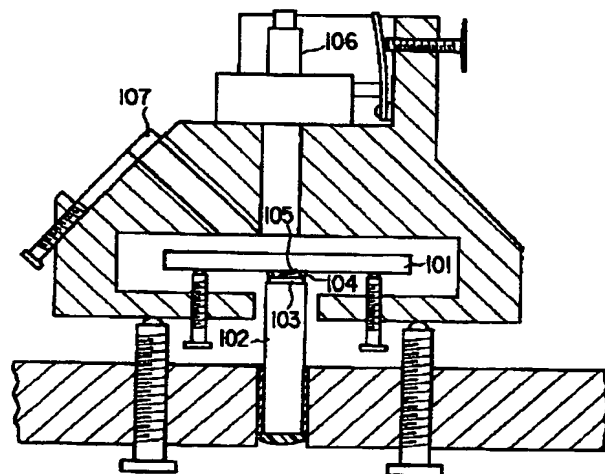
【図4】



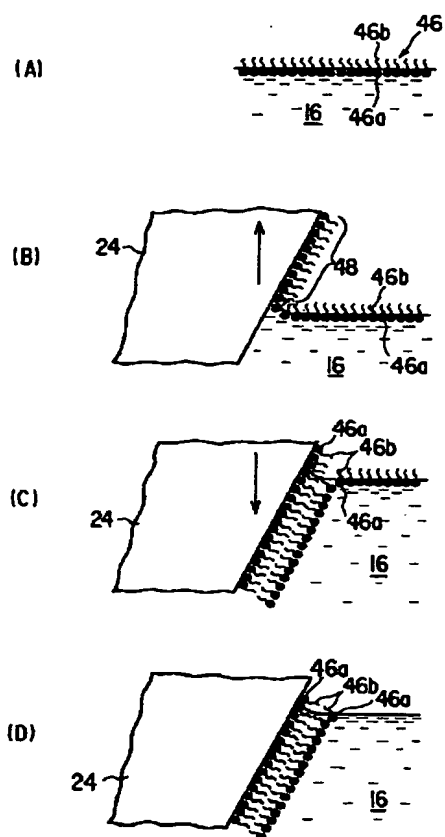
【図2】



【図5】



【図3】



【図6】

